باسمه تعالی

جزوه آزمایشگاه سلولی و مولکولی

نیمسال دوم ۹۲

کیفی

@sarayedaneshjo
@sarayedaneshjo

فهرست:

۱) استخراج DNA ۴

الف- تهیه عصاره سلولی ۴

ب- خالص سازی DNA ۴

- استخراج DNA از ۳CC خون تام به روش غیر آنزیمی (Salting out) ۵
  - مواد مورد نیاز ۵
  - مورد نیاز ?دستگاه ها ۶
  - روش کار ۶
  - ?اب?ب ?ع ۷
- استخراج DNA از مقادیر کم خون (۳۰۰µL خون) به روش Salting out ۷
  - مواد مورد نیاز ۷
  - مورد نیاز ?دستگاه ها ۷
  - روش کار ۸
- استخراج DNA ? با استفاده از کیت تجاری ۹
  - مواد مورد نیاز ۹
  - دستگاه های مورد نیاز ۹
  - روش کار ۹

۲) واکنش زنجیره ای پلیمراز Polymerase Chain Reaction ۱۰

- مقدمه ۱۰
- مکانیسم ۱۰
- مواد مورد نیاز ۱۲
- اختصاصی بودن واکنش ۱۵
- آلودگی های PCR ۱۶
- مشکل PCR و راه حل آن ۱۶
- ?کاربردهاPCR ۱۷
- انواع PCR ۲۰
- بایدها و نبایدها در PCR ۲۴
- انجام آزمایش PCR ۲۴
- آشکارسازی و تجزیه تحلیل محصولات PCR ۲۵

۳) الکتروفورز ۲۵

- تعریف ۲۵
- تهیه ژل آگارز ۲۷
- رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید ۲۸
- بررسی نتایج PCR با دستگاه Gel documentation ۲۸
- تعیین اندازه قطعه تکثیر شده در PCR ۲۹
- اتیدیوم برماید ۲۹
- ساخت بافر TAE 50X ۲۹
- ساخت بافر TBE 5X ۳۰

۴) منابع ۳۱

@sarayedaneshjo

مقدمه:

واکنش زنجیره ای پلی مراز یک روش آزمایشگاهی است که به منظور تولید انبوه قطعه خاص و انتخابی ازDNA به کار می‌رود. واکنشی مبتنی بر تکثیر آنزیمی قطعه‌ای از DNA است که با استفاده از دو آغازگر چند نوکلئوتیدی صورت می گیرد. امروزه تکنیک PCR جایگاه رفیع و بسیار مهمی را در جنبه های مختلف مهندسی ژنتیک، بیولوژی مولکولی، میکروب شناسی تشخیصی، تشخیص سرطان و بیماریهای ژنتیکی، تشخیص هویت، پزشک قانونی، باستان شناسی، مطالعات تکاملی موجودات وغیره پیدا کرده است.

اهداف:

با توجه به پیشرفت روزافزون علوم پزشکی در جهان امروز و استفاده وسیع از PCR بعنوان یک روش حساس، سریع و دقیق تشخیصی در آزمایشگاههای بالینی، در این کارگاه سعی شده است تا PCR و مکانیسم آن به زبانی ساده و بطور اجمالی بیان شود تا علاقه مندانی که در عرصه های آزمایشگاهی از نزدیک با این تکنیک بسیار مفید کار نکرده اند با چگونگی عملکرد آن آشنایی پیدا کنند. ذکر این نکته ضروری است که راه اندازی این روش و یا روش های مشابه در زمینه بیولوژی مولکولی و بهره وری از آنها در مراکز آزمایشگاهی و تحقیقاتی، منجر به حصول نتایج چشمگیر و سودمند در زمینه تشخیص آزمایشگاهی و همچنین مطالعات اپیدمیولوژیک خواهد شد.

در این کارگاه پس از آموزش تئوری ، شرکت کنندگان مراحل استخراج DNA از خون تام را به دو روش Salting out و ستونهای استخراج تجاری انجام داده، بر روی همان نمونه DNA، آزمایش PCR را انجام می دهند و سپس نتایج را با الکتروفورز بررسی می کنند.

@sarayedaneshjo

۱) استخراج DNA:

نخستین گام در بررسی مولکولی ساختار ژنتیک سلول ها دسترسی به مادهٔ ژنتیک می باشد. اصول استخراج مادهٔ ژنتیک از سلول های مختلف (باکتری ها، سلول های گیاهی و سلول های جانوری) نسبتاً یکسان است و تنها در برخی از جزئیات تفاوت هایی وجود دارد. استخراج اسید های نوکلئیک شامل دو مرحله تهیه عصارهٔ سلولی و خالص سازی می باشد.

الف-تهیه عصاره سلولی

برای تهیه عصارهٔ سلولی به تعداد زیادی سلول نیاز است. عموماً سلول ها با تکثیر در محیط کشت ویا مستقیماً از بافت ها (مانند بافت خون) تأمین می شوند. سپس باید دیواره و غشاء سلول ها از بین بروند تا محتویات آن ها آزاد شوند. برای تخریب دیواره یا غشاء سلولی، روش های فیزیکی و شیمیایی مختلفی به کار می رود. از روش های فیزیکی می توان به شوک اسمزی، سائیدن سلول های یخ زده و استفاده از امواج صوتی یا سونیکیشن اشاره کرد. در روش های شیمیایی از آنزیم ها و موادی که باعث تخریب دیواره و غشاء می شوند استفاده می شود. برای مثال، برای شکستن دیوارهٔ باکتری ها از آنزیم لیزوزیم یا اتیلن دی آمین تتراستات (EDTA) یا مخلوطی از آن ها استفاده می شود. لیزوزیم با عمل آنزیمی خود باعث تجزیه پپتید و گلیکان دیوارهٔ سلولی می شود و EDTA که یک عامل شلات کننده است با حذف یون های فلزی مانند Ca^{2+} و Mg^{2+} که در استحکام دیواره نقش دارند، دیواره را سست می کند. به علاوه EDTA با حذف یون های فلزی که به عنوان گروه پروتستتیک در آنزیم های تجزیه کننده اسید های نوکلئیک عمل می کند، مانع تجزیه این مواد می شود. در سلول های جانوری به علت فقدان دیواره سلولی، با یک شوک اسمزی ساده می توان غشاء سلول ها را شکست. با این حال اغلب از موادی مانند سدیم دود سیل سولفات (SDS) ، دو دسیل سارکوزین و تریتون X100 که غشا را در خود حل می کنند استفاده می شود، SDS همچنین باعث پایداری اسیدهای نوکلئیک می شود. مراحل تهیه عصاره سلولی باید در محلول های محافظت کننده اسیدهای نوکلئیک که معمولاً حاوی بافرتریس هیدروکلرید (Tris-HCl) ، SDS و EDTA است انجام شود تا کمترین آسیب به مادهٔ ژنتیک برسد. برای استخراج مادهٔ ژنتیک سلول های انسانی، معمولاً از سلول های سفید خون که یک تا سه ساعت مانده اند یا خون منجمد، سلول های کشت یافته مانند کشت فیبروبلاست ها، کشت سلول های پرز های جنینی (CVS) یا کشت سلول های مایع آمنیوتیک استفاده می شود.

ب- خالص سازی DNA

برای خالص سازی DNA برحسب نوع سلول و کاربرد مورد نظر، روش های مختلفی ابداع شده است. روش های مزبور از اصول یکسانی تبعیت می کنند که شامل رسوب دادن مرحله به مرحله ناخالصی ها و استخراج DNA خالص می باشد. در این روش ها ابتدا با کمک مواد واسرشت کننده پروتئین ها نظیر فنل، این مواد از عصاره سلولی حذف می شوند. سپس DNA در فاز قطبی به صورت محلول استخراج می شود. اگر مقدار پروتئین ها زیاد باشد می توان قبل از مرحله فوق پروتئین ها را با آنزیم های تجزیه کننده مانند پروتئیناز k تجزیه و حذف نمود .

پس از جدا کردن فازآبی، می توان با اضافه کردن الکل هائی نظیر اتانول یا ایزوپروپانول در حضور کاتیون Na^{+} یا آمونیوم، اسیدهای نوکلئیک را رسوب داد. در سلول های گیاهی و سلول های بافت کبد که مقدار هیدرات های کربن زیاد است برای خالص سازی اسیدهای نوکلئیک از CTAB(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) و محلول نمک استفاده می شود. این محلول فقط باعث رسوب اسیدهای نوکلئیک می شود و پلی ساکاریدها به صورت محلول باقی می مانند. رسوبی که به

@sarayedaneshjo

روش های فوق به دست می آید حاوی مخلوطی از RNA و DNA است. برای خالص سازی DNA می توان با اضافه کردن ریبونوکلئاز، RNA را هیدرولیز کرده و DNA خالص به دست آورد.

امروزه شرکت های مختلف تهیه کننده مواد بیولوژی مولکولی اقدام به تهیه کیت هایی برای استخراج اسید های نوکلئیک از منابع مختلف سلولی نموده اند که در صورت عدم وجود محدودیت مالی در آزمایشگاه می توان با استفاده از کیت های مزبور در مدت زمان کم و با بازده نسبتاً بالائی اقدام به تهیه اسید های نوکلئیک با درجه خلوص بالا نمود. به علاوه سیستم های روبوتیک مختلفی اختراع شده اند که روزانه قادر به استخراج هزاران نمونه از اسید های نوکلئیک از نمونه های مختلف میکروبی، گیاهی و حیوانی می باشند.

استخراج DNA از ۳cc خون تام به روش غیر آنزیمی (Salting out)

در این روش پس از لیز RBC و WBC، DNA توسط معرّف هایی با غلظت نمکی متفاوت، پروتئین زدایی می شود. سپس DNA توسط اتانل استخراج شده و نمک زدایی می گردد و نهایتاً به صورت محلول نگهداری می گردد.

مواد مورد نیاز:

۱. CLB (Cell Lysis Buffer)
۲. TKM 1
۳. TKM 2
۴. SDS 10%
۵. 6M NaCl
۶. Ethanol 100%
۷. Ethanol 70%
۸. (Tris- EDTA) TE

– محلولهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۸ پس از تهیه، اتوکلاو می گردد.

مواد لازم برای تهیه محلول CLB، TKM1 و TKM2:

CLB (Cell Lysis Buffer)	TKM1	TKM2	TE	SDS* 10%
Sucrose	Tris HCl(2M, PH=7.6)	Tris HCl(2M, PH=7.6)	Tris HCl (2M, PH=7.7)	SDS
Tris HCl (2M, PH=7.7)	KCl(3M)	KCl(3M)	EDTA(0.5M, PH=8)	ddH2O
MgCl2 (1M)	MgCl2(1M)	MgCl2(1M)	H_2O	
Triton X100	EDTA(0.5M)	EDTA(0.5M)		
H_2O	H_2O	NaCl(5M)		
		H_2O		

*Sodium Dodecyl Sulfate

@sarayedaneshjo

دستگاه های مورد نیاز:

۱ - دستگاه سانتریفوژ لوله

۲ - بن ماری

۳ - انکوبه ۳۷ °C

روش کار:

برای جلوگیری از انعقاد، ۱cc از EDTA ۱۰٪ به ۱۰cc خون اضافه می شود. از هپارین به دلیل مهار PCR استفاده نمی شود.

۱. برای استخراج DNA از ۳cc خون تام، ابتدا ۹cc از محلول CLB را در یک لوله آزمایش ریخته و ۳cc خون تام را به آن اضافه می کنیم (این مرحله جهت لیزکردن سلول ها انجام می شود). سپس نمونه ها را با دور ۲۵۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می کنیم. پس از آن محلول رویی را سریعاً دور ریخته و پلت (Pellet) انتهای لوله را نگه می داریم. در صورت لیز نشدن گلبولهای قرمز مرحله فوق با مقدار ۲cc CLB که به پلت (رسوب) اضافه می شود، تکرار می کنیم.

۲. در مرحله بعد بر روی پلت مقدار ۵cc از محلول TKM1 اضافه می کنیم تا دیواره هسته لنفوسیت ها پاره شده محتویات آن جهت استخراج DNA آزاد شود. این لوله را به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۵۰۰rpm سانتریفوژ می کنیم و سپس محلول رویی آن را دور می ریزیم که این بار پلت سفید رنگی در انتهای لوله باقی خواهد ماند.

۳. در این مرحله بر روی پلت مقدار ۱/۵cc TKM2 اضافه کرده و مقدار ۱۰۰µl SDS ۱۰٪ اضافه می کنیم و لوله را به مدت نیم ساعت در دمای ۶۵°C بن ماری حرارت می دهیم. در این مرحله حذف پروتئین ها از محیط DNA خالص تری را به دست می آوریم. در صورت عدم حل شدن رسوب، انکوباسیون را ادامه می دهیم تا رسوب کاملاً حل شود. این مرحله را می توان در ۳۷ °C به صورت انکوباسیون شبانه (overnight) نیز انجام داد.

۴. پس از اینکه محلول داخل لوله تقریباً شفاف شد به مقدار NaCl 6M 570µl به آن افزوده و مخلوط کرده در دور ۲۹۰۰rpm به مدت ۱۰دقیقه سانتریفوژ می کنیم.

۵. در مرحله بعد ابتدا در یک لوله آزمایش استریل مقدار ۴cc الکل ۹۶° سرد می ریزیم. پس از اتمام سانتریفوژ محلول رویی آن را به لوله حاوی الکل ۹۶ اضافه می کنیم. در لوله پارافیلم گرفته و به آرامی آن را تکان می دهیم تا ابر DNA در آن تشکیل گردد.

۶. در یک میکروتیوب ۱/۵cc مقدار ۱cc الکل ۷۰٪ می ریزیم و DNA تشکیل شده در لوله را با نوک سمپلر به آرامی به میکروتیوب منتقل می کنیم.

۷. در این مرحله میکروتیوب ها را در دور ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می کنیم. از الکل ۷۰٪ برای شستشوی محیط از ناخالصی ها استفاده می کنیم. پس از اتمام سانتریفوژ پلت سفید رنگی در انتهای میکروتیوب دیده می شود. محلول رویی آن را دور ریخته و میکروتیوب را با در باز به مدت ۱۵-۱۰دقیقه می گذاریم در محیط خشک شود. الکل باید کاملاً خشک شود، چون الکل از عوامل مهار کننده در PCR است. البته DNA نباید خیلی خشک شود چون ساختمان ژنومیک آن دچار شکست می شود.

۸. در این مرحله بر روی پلت مقدار ۳۰۰ µl از TE که مایع نگهدارنده DNA است اضافه می کنیم. سپس میکروتیوب را یک شب در دمای ۳۷°C در انکوباتور قرار می دهیم تا پلت DNA کاملاً حل شود. روز بعد DNA آماده استفاده جهت انجام مراحل PCR است.

@sarayedaneshjo

عیب یابی:

مشکل	علت	رفع مشکل
در مرحله ۱ پلت زیاد و قرمز پُر رنگ مشاهده می شود	RBCها کاملا لیز نشده اند.	در مواردی که از خونی استخراج می کنید که مدت زمانی در یخچال یا فریزر نگهداری شده است، بروز این مشکل غیر منتظره نیست و معمولاً با تکرار مرحله ۱ مشکل برطرف می شود اما اگر خون تازه تهیه شده است، علت تشکیل این لخته خوب مخلوط نکردن خون با CLB است.
پلت مرحله ۲ سفیدرنگ نیست	محلول رویی از مرحله قبل کاملا خالی نشده است و بقایای RBC ها هنوز باقی مانده است	می توانید مرحله ۲ را با ۱/۵ سی سی TKM1 تکرار کنید
محلول رویی در مرحله ۵ کاملا از رسوب جدا نشده است و برداشتن محلول رویی به سختی امکان پذیر است	در مرحله ۴ NaCl به خوبی با محلول TKM2 و SDS مخلوط نشده است	بهتر است برای اطمینان از خوب مخلوط شدن آنها را چند بار با سمپلر پیپت کنید و بعد سانتریفوز نمایید

استخراج DNA از مقادیر کم خون (۳۰۰µL خون) به روش Salting out:

در مواردی که میزان خون کم است می توان با کاهش مقادیر بالا به نسبت مشخص استخراج را انجام داد.

مواد مورد نیاز:

1) CLB (Cell Lysis Buffer)
2) TKM 1
3) TKM 2
4) SDS 10%
5) NaCl 6M
6) Ethanol 100%
7) Ethanol 70%
8) TE

دستگاه های مورد نیاز:

۱. دستگاه میکرو فیوژ
۲. بن ماری
۳. انکوبه ۳۷ °C

@sarayedaneshjo

روش کار:

به عنوان مثال برای استخراج DNA از ۳۰۰μL خون می توان از روش زیر استفاده نمود:

1) 900μL CLB + 300μL Blood → Invert
2) 10000rpm- 2min
3) Pellet + 500 μL TKM1→ Invert
4) 10000rpm- 2min
5) Pellet + 150 μL TKM2 + 10 μL SDS 10% → Invert → 65 ºC until dissolving the pellet (approximately 10-30 min)
6) Add 57 μL NaCl 6M → Pipetting
7) 12000 rpm- 2 min
8) Transfer Supernatant to 400 μL Chilled Ethanol (96%) → Invert
9) 14000rpm-2min
10) Pellet + 200 μL Ethanol 70% → Invert
11) 14000rpm-2min
12) Let pellet to dry
13) Pellet + 30μL TE → 37ºC, Overnight

@sarayedaneshjo
@sarayedaneshjo

استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری:

مواد مورد نیاز:

کیت استخراج DNA ژنومی

دستگاه های مورد نیاز:

میکروفیوژ

انکوبه

روش کار:

1) 20µL Proteinase K solution (20 mg/mL) + 200 µL blood + 200 µL GB buffer
2) Pulse vortexing- 15 sec
3) 56ºC- 10 min
4) 200 µL absolute ethanol
5) Pulse vortexing- 15 sec
6) Transfer lysate to spin column
7) 8000 rpm- 1min
8) Transfer column to a new 2 mL collection tube
9) 500 µL GW1
10) 8000 rpm- 1min
11) Discard flowthrough and transfer spin column to a new 2mL collection tube
12) 500 µL GW2
13) 8000 rpm- 1min
14) Discard flowthrough and reassemble spin column
15) 12000 rpm- 2min
16) Transfer spin column to a new 1.5 mL tube
17) 200 µL GE
18) Room temperature- 1min
19) 8000 rpm- 1min
20) Discard spin columns and use the flowthrough for PCR

@sarayedaneshjo

۲) واکنش زنجیره ای پلیمراز Polymerase Chain Reaction

مقدمه:

تکنیک PCR در اواسط دهه ۱۹۸۰ در دپارتمان ژنتیک انسانی به وسیله Kary Mullis ابداع و برای تکثیر ژن کم خونی داسی شکل و بتاگلوبین انسانی مورد استفاده قرار گرفت. در سال Saiki 1985 از پژوهشگران یک شرکت مهندسی مشکلات موجود را رفع کرد و روش متداول کنونی را ابداع نمود. حقوق تجاری این اختراع اینک به شرکت هافمن - روچت تعلق دارد. Kary Mullis در سال ۱۹۹۳ موفق به کسب جایزهِ نوبل شیمی گردید. واکنش زنجیرهِ پلی مراز یک روش آزمایشگاهی است که به منظور تولید انبوه قطعه خاص و انتخابی ازDNA به کار می‌رود. واکنش مبتنی بر تکثیر آنزیمی قطعه‌ای از DNA است که با استفاده از دو آغازگر چند نوکلئوتیدی که مکمل پایانه ’۵ هر دو رشته مورد نظر هستند، صورت می‌گیرد تا کپی شدن الگوی DNA توسط آنزیم پلیمراز امکان‌پذیر شود. در سال ۱۹۸۵ تنها سه مقاله علمی در زمینه PCR گزارش شده بود. پنج سال بعد از آن این روش در هزاران آزمایشگاه استفاده گردید و تاکنون هزاران مقاله و دَه ها کتاب مستقل به این موضوع اختصاص داده شده است به گونه‌ای که دانشگاه آکسفورد حتی مجله‌ای به نام PCR منتشر می‌سازد.

به عقیده بیولوژیست ها PCR وسیله‌ای است که سوزنی را در کوهی از کاه پیدا می کند. PCR از نظر اصولی عملی تشابه زیادی به همانند سازی DNA دارد و در واقع برگرفته از آن است. به طورکلی دو فرق بین PCR و همانندسازی وجود دارد: همانند سازی در بدن در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با آنزیم DNA پلی مراز و آنزیم های دیگر صورت می‌گیرد در PCR به علت نیاز به درجه حرارت بالا جهت واسرشت شدن از آنزیم مقاوم به حرارت همانند Taq استفاده می‌شود و به جای سایر آنزیم ها ازتغییرات درجه حرارت استفاده می‌شود.

امروزه تکنیک PCR جایگاه رفیع و بسیار مهمی را در جنبه های مختلف مهندسی ژنتیک، بیولوژی مولکولی، میکروب شناسی تشخیصی، تشخیص سرطان و بیماریهای ژنتیکی، تشخیص هویت، جرم شناسی (پزشک قانونی جهت تشخیص منشاء نمونه اسپرم، خون و ...) باستان شناسی، مطالعات تکاملی موجودات وغیره پیدا کرده است.

مکانیسم:

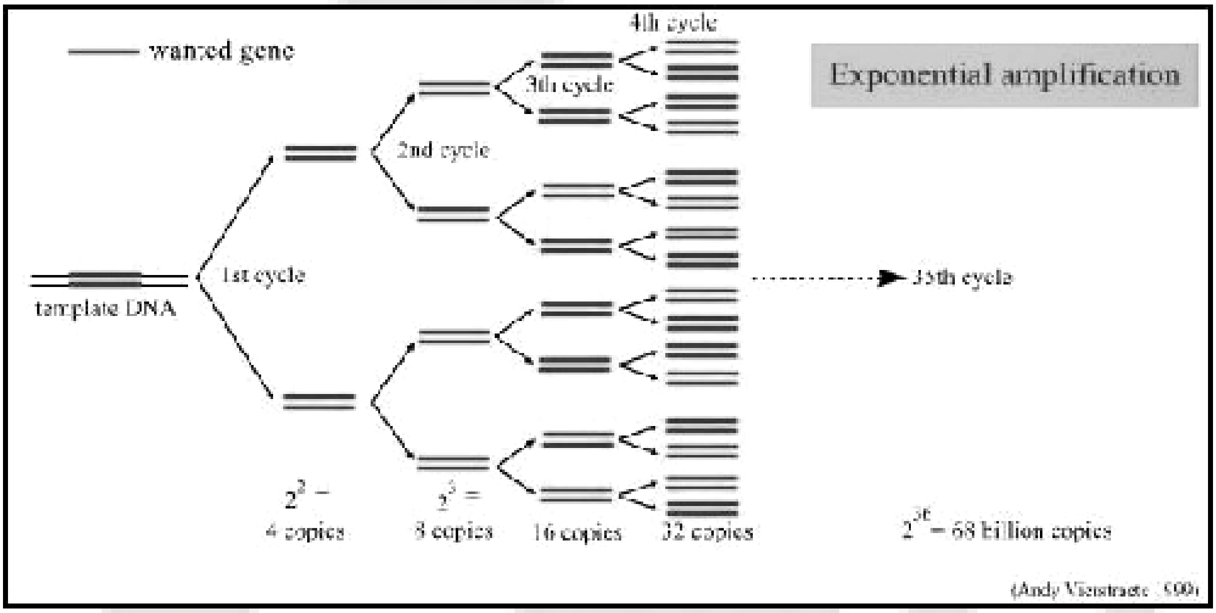
در این تکنیک اصول همانند سازی DNA داخل سلول در لوله تقلید و تکرار می گردد. DNA پلی مراز، DNA تک رشته ای را از جهت ´3→´5 به عنوان الگو مورد استفاده قرار می دهد و رشته مکمل را در جهت ´5→´3 می سازد. همچنین DNA پلی مراز برای شروع احتیاج به یک قطعه اولیه یا پرایمر (Primer) دارد.

به طور کلی پرایمر یک قطعه اولیگونوکلئوتیدی کوچک است که انتهای 3´OH را برای شروع همانند سازی DNA پلی مراز فراهم می کند.

@sarayedaneshjo

تکنیک PCR شامل سیکل های تکرار شونده ای است که در آن به کمک یک سری پرایمر، و با کمک آنزیم از روی یک DNA الگو، عمل همانند سازی انجام می گیرد. این پرایمرها، مکمل بخش هایی از DNA هدف هستند. پرایمرها زمانی که دو رشته DNA به وسیله حرارت، دناتوره شود با کاهش دما در مرحله بعد به سکانس های خاص مکمل خود می چسبند (Anneal).

برای شکستن هر باند A=T، دو درجه سانتیگراد، و برای شکستن هر باند G=C، چهار درجه سانتیگراد حرارت لازم است که به آن اصطلاحاً دمای ذوب (Melting Temperature, Tm) می گویند. اما برای این که C به G و A به T باند شود، با توجه به مشخصات پرایمر مورد استفاده، حرارت مورد نیاز را تعیین می نمایند. DNA دو رشته ای به وسیله حرارت از هم باز می شوند و چون غلظت پرایمر زیاد است وصل شدن پرایمر به مکملش انرژی نمی خواهد و به راحتی به مکمل خود می چسبد.



به طور کلی هر سیکل PCR شامل سه مرحله است::

۱. مرحله باز شدن یا واسرشت شدن دو رشته DNA (Denaturing step)

DNA دو رشته ای در اثر حرارت در حضور پرایمرها، چهار dNTP و DNA پلی مراز مقاوم به حرارت باز می شود. دناتوراسیون حرارتی به طور معمول در طیف دمایی ۹۳-۱۰۰°C انجام می شود.

۲. چسبیدن پرایمرها به هدف (Annealing step)

با کاهش دما به ۳۷-۶۵°C (بسته به Tm پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی)، پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی به DNA هدف دناتوره شده می چسبند.

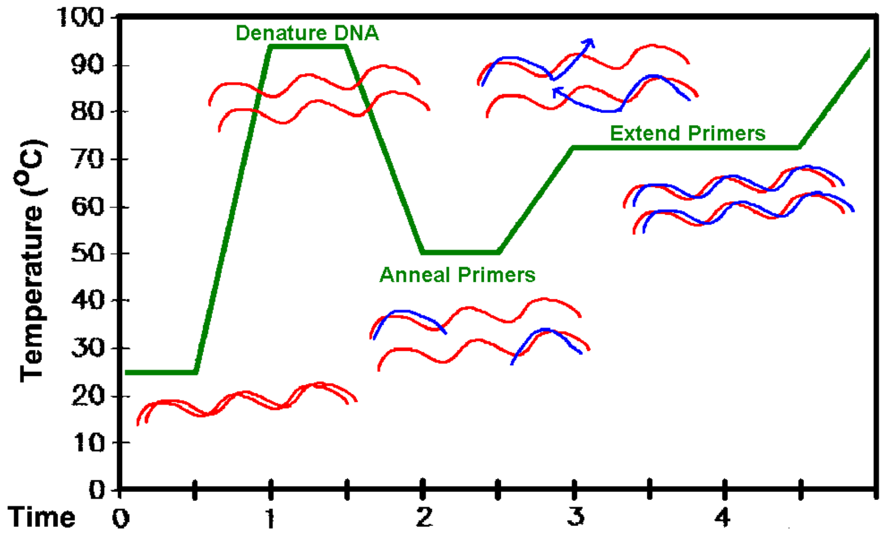
۳. ساخت رشته مکمل هدف (Extension step)

آنزیم DNA پلی مراز مقاوم به حرارت به دنبال پرایمر ها و با استفاده از سکانس هدف، عمل پلیمریزاسیون را در ۷۲ °C انجام می دهد.

یک پروتکل تیپیک PCR شامل ۴۰-۲۵ سیکل حرارتی است. از نظر تئوری، در هر سیکل تعداد سکانس های هدف دو برابر می شود. بنابراین تکرار سیکل های حرارتی باعث افزایش سکانس هدف به شکل تصاعدی می گردد.

@sarayedaneshjo

در سیکل اول اندازه دو رشته به وجود آمده بزرگتر از سکانس واقعی مورد نظر است. چرا که در فرمان داده شده جهت ساخت رشته مکمل، DNA پلی مراز از انتهای سکانس مورد نظر جلوتر رفته، محصول PCR بزرگتر از سکانس مورد نظر را تولید می کند. با این وجود، بعد از سیکل دوم، فرآورده های حاصل دارای اندازه مورد نظر هستند که به آن ها محصول کوتاه (Short PCR Product of PCR) هم گفته می شود. هم اندازه با طول سکانس مورد نظر هستند (یعنی از ابتدای پرایمر دوم).



مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR

۱ – DNA یا cDNA الگو

۲ – پرایمرها یا قطعات کوچک DNA

۳- چهار باز سازنده DNA یا dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

۴ – آنزیم DNA پلی مراز مقاوم به حرارت مانند Taq-DNA Polymerase

۵ – وجود شرایط بافری مناسب و یون Mg2+

پرایمر (آغازگر)

همان طور که در توضیح مکانیسم PCR گفته شد، پرایمرها یک رشته نوکلئوتیدی ۱۸-۲۴ بازی می باشند که به نقاط مکمل خود بر روی رشته الگو متصل شده و سبب مشخص شدن ناحیه تکثیر مورد نظر می شوند. در واقع علاوه بر عمل گفته شده، پرایمر ها گروه OH– '3 مورد نیاز جهت عمل پلی مرازی آنزیم را در واکنش PCR فراهم می آورند. در طراحی و بهینه سازی پرایمرها مواردی باید رعایت شود تا بتوانیم از اتصالات غیر اختصاصی جلوگیری نماییم.

@sarayedaneshjo

طراحی پرایمر

قواعد مشخصی برای این که بتوان با اطمینان یک جفت پرایمر موثّر را انتخاب کرد وجود ندارد. در حال حاضر پرایمر بیش از هر عامل دیگری عامل موفقیت یا شکست در یک واکنش تکثیری است. بعضی قواعد راهنمایی‌های مفیدی را در مورد طراحی آغازگر می کنند که در ذیل به آن ها اشاره شده است.

- طول متوسط هر پرایمر بین ۱۸– ۳۰ جفت باز است. پرایمر با طول کوچک اتصال غیراختصاصی را افزایش و پرایمر بزرگتر سرعت هیبریداسیون را کم می کند.
- مقدارG-C دو پرایمر با هم مشابه بوده و حدود ۵۰-۶۰ درصد باشد.
- آغازگرها باید از نظر مکمل بودن با هم کنترل شوند.

پرایمر دایمر یا آغازگر دوتایی یک تکثیر مصنوعی است که اغلب در محصول PCR مشاهده می‌شود و عبارتست از یک قطعهِ دو رشته‌ای که طول آن تقریباً به مجموع دو پرایمر نزدیک است و هنگامی مشاهده می‌شود که یک پرایمر توسط آنزیم پلیمراز به روی پرایمر دیگر گسترش یابد. مکانیزم واقعی که چگونه پرایمر دایمر تشکیل می‌شود به درستی مشخص نیست. پرایمرها با انتهای مکمل ۳ً مستعد تشکیل دایمر هستند. ضعف در آنزیم Taq باعث پلیمریزاسیون مستقیم الگوی غیر هدف شود. در هر حال چنان چه پرایمر دایمر به عنوان مانعی مشاهده شود، می‌توان آن را تا حدودی با غلظت حداقل پرایمر و آنزیم کاهش داد.

- در انتهای ۳ً پرایمر باید حداقلC یا G قرار گیرد. در توالی‌های پرایمرهایی که انتهای۳ً آنها غنی از G+C می‌باشد احتمال اتصال اشتباهی افزایش می‌یابد.
- نسبت چهار نوکلئوتید در آغازگر حتی‌المقدور یکسان باشد.
- آغازگر به توالی تکرار شونده ختم نشود.
- دمای Tm دو آغازگر نزدیک هم باشد.
- حدّ مجاز دمای اتصال پرایمر طراحی شده باید بین ۶۵-۵۵ باشد. دمای تکثیر ایده‌آل ۷۲-۶۲ می‌باشد.

درجه حرارتی که پرایمر به DNA الگو متصل می‌شود به طول آغازگر و مقدار GC آن بستگی دارد. برای پرایمرهای حاوی ۵۰٪GC و دارای ۲۰ نوکلئوتید، دمای ۵۵ درجه سانتیگراد پیشنهاد می‌شود. برای افزایش اختصاصی عمل کردن آغازگر حتی ممکن است دماهای بالاتری هم مورد نیاز باشد.

برای اینکه هر پرایمر با رشته الگوی خودش هیبرید شود لازم نیست که عیناً و کاملاً مکمل رشته الگو باشد. برای طراحی پرایمر اغلب از برنامه‌های کامپیوتری ویژه استفاده می‌شود. فاصله بین پرایمرهایی که با DNAی هدف هیبرید می‌شود به طور معمول کمتر از ۱۵ کیلو باز می‌باشد. در حقیقت یک کاهش اساسی در سنتز موثر هنگامی که محصول تکثیر متجاوز از1000 Kb می‌شود، مشاهده می گردد. به همین دلیل طول قطعه مورد تکثیر در PCR نباید بیش از3KB باشد وحدّ مطلوب کمتر از 1KB می باشد. تکثیر قطعات بسیار طویل و بالای 40KB مقدور است اما نیاز به روش های ویژه‌ای دارد.

دمای ذوب پرایمر (Tm)

دمای اتصال باید به قدر کافی پایین باشد تا پرایمر وDNA الگو قادر به اتصال باشند و از سوی دیگر باید به قدر مناسب بالا باشد تا از تشکیل اتصالات غیراختصاصی جلوگیری کند. دمای اتصال از روی شاخصی به نام درجه حرارت ذوب محاسبه می‌شود. دمای ذوب درجه حرارتی است که درآن نیمی از DNA به صورت تک رشته‌ای درآمده است. یکی از مهمترین مشخصات Tm وابستگی آن به ترکیب بازی DNA است. G وC سه پیوند هیدروژنی و بازهای آدنین و تیمین دوپیوند هیدروژنی دارند. بنابراین هر چقدر مقدار گوانین و سیتوزین درDNA بیشتر باشد Tmبیشتراست. دمای ۲-۱ درجه سانتیگراد کمتر ازTm کافیست که

@sarayedaneshjo

هیبریداسیون بین پرایمر وDNAی الگودر آن صورت گیرد. دمای ذوب به طور معمول از طریق فرمول سادهِ زیر نیز محاسبه می‌شود.

$$Tm = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$ *برای هر پرایمر ۲۰ نوکلئوتیدی*

دو پرایمر باید طوری طراحی شوند که دارایTm یکسان باشند در غیر اینصورت در حرارت مناسب برای یک پرایمر برای جفت دیگر نامناسب خواهد بود. بسیاری از آزمایشگاه ها دمای چسبیدن را از ۵-۳ درجه سانتیگراد زیر دمای ذوب (Tm) که از طریق این فرمول محاسبه شده است درنظر می گیرند. از این موضوع نتیجه گرفته می‌شود که‌پرایمرهای با طول زیاد باعث افزایش و بالا رفتن اختصاصی بودن واکنش نمی‌شود.

دی اکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP)

یک PCR معمولاً با غلظت حدود ۲۰۰ میکرومولار از dNTP انجام می شود. اگرچه در غلظت های پا یین تر dNTP یعنی ۱۰۰-۱۰ میکرومولار، آنزیم Taq دارای صحت بالاتری است، با این وجود، غلظت بهینه dNTP بستگی دارد به :

غلظت MgCl2

سختی واکنش(The reaction stringency)

غلظت پرایمر

طول محصول تکثیر شونده

تعداد سیکل ها

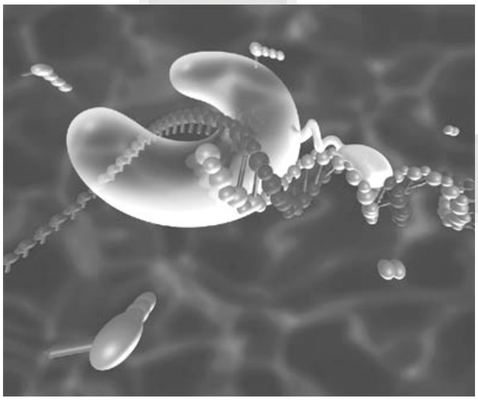
جهت بهینه نمودن یک PCR ضروری است که بهترین غلظت dNTP، به‌طور تجربی تعیین شود.

آنزیم های پلی‌مراز

DNA پلی مرازها آنزیم هایی هستند که با استفاده از منومرهای دی‌اکسی نوکلئوزیدتری فسفات و با الگو قرار دادن رشته اصلی ساخت زنجیره پلی نوکلئوتیدی را تسریع می‌کنند. ساختDNA معمولا از جهت ′۵ بطرف ′۳ است. DNA پلی مراز برخلافRNA پلی‌مراز نیاز به قطعه DNA کوچک یا پرایمر برای چسبیدن به توالی مکمل دارد.

DNA پلی‌مراز Taq

حسن این نوعDNA پلی مراز مقاوم بودن آنها در درجه حرارت بالا (۹۰-۹۵ درجه سانتیگراد) است. علاوه بر این آنزیم Taq می‌تواند قطعات DNA به طول ۱۰ هزار جفت را تکثیر کند. استفاده ازDNA پلیمراز مقاوم به حرارت حاصل از باکتری ترموس آکواتیکوس که منشاءچشمه آب گرم پارک ملی یلواستون می‌باشد باعث ساده و خودکار شدن واکنش می‌شود. پلی‌مرازهای مقاوم در برابر حرارت موجب شده‌اند که بسط اختصاصی فرآورده PCR



Taq DNA polymerase

@sarayedaneshjo

به خاطر اتصال و بسط آغازگر در دمای بالا افزایش یابد. دمای مناسب برای فعالیت این آنزیم با توجه به الگوی DNA ، برابر ۸۰-۷۵ درجه سانتیگراد است. در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد بیش از ۶۵ نوکلئوتید در ثانیه پلی مریزه می‌شود. غلظت توصیه شده برای Taq پلی‌مراز بین ۲/۵-۱ واحد در صد میکرو لیتر واکنش توصیه شده است. در صورتی که غلظت آنزیم بسیار بالا باشد، فرآورده‌های زمینه‌ای غیراختصاصی افزایش‌می‌یابد و پایین بودن بیش از حد غلظت نیز باعث کم شدن فرآورده‌های مورد نظر می‌شود. برای‌تکثیر DNA ژنومی یک غلظت بهینه از Taq معمولاً حدود ۴-۱ واحد درصد میکرولیتر واکنش‌توصیه می‌شود.

بافر PCR

بافرهای متعددی جهت PCR قابل دسترسی است. معمول ترین بافر مورد استفاده برای Taq است که به شکل 10X ارائه می گردد:

100mM Tris-HCl, PH=8.3
500 mM KCl
15 mM MgCl2
0.1% (W/V) gelatin

اجزای بافر مورد استفاده در مورد سایر پلی مرازهای مقاوم به حرارت متفاوت است. مع ذلک اکثر تولید کنندگان، بافر 10X را همراه با آنزیم مربوطه ارائه می دهند.

MgCl2

غلظت نهایی MgCl2 در مخلوط واکنش می تواند متغیر باشد. معمولاً این میزان ۵mM-۰/۵ (متناسب با نوع کار) است. یون +Mg2 قادر است:

- با dNTPs کمپلکسی محلول تشکیل دهد که برای داخل کردن dNTP در واکنش ضروری است.
- فعالیت پلی مرازی آنزیم Taq DNA pol را تحریک می کند.
- دمای ذوب (Tm) DNA و واکنش متقابل پرایمر/الگو را افزایش می دهد.

غلظت MgCl2 دارای اثرات جدی بر ویژگی و محصول PCR می باشد. غلظت ۱/۵mM-۱ از MgCl2 معمولاً غلظتی بهینه است اما در برخی موارد، مقادیر متفاوت +Mg2 ممکن است مورد نیاز باشد. به طور معمول، مقدار کم MgCl2 منجر به محصول کم و +Mg2 اضافی منجر به جمع شدن محصول غیر اختصاصی می گردد.

اختصاصی بودن واکنش

آنزیم مناسب و کنترل عواملی از جمله غلظت آنزیم، غلظت قطعات آغازگر، همانندسازی درجه حرارت دقیق و زمان نگهداری محیط عمل در یک درجه حرارت معین و تعداد چرخه در هرآزمایش همه در اختصاصی بودن واکنش اثر می‌گذارند. به طور کلی عواملی که در کارآیی PCR ایفای نقش می‌کنند عبارتند از:

غلظت MgCl2 ، کیفیت و کمیت DNA الگو، بافرPCR، غلظتdNTP، افزاینده‌های PCR، بازدارنده‌های PCR،Nested PCR،Hot Start PCR، تعداد سیکل PCR و دمای اتصال‌پرایمر.

@sarayedaneshjo

آلودگی های PCR

در آزمایش PCR باید از تکثیر آلوده‌کننده‌هایی مانند DNA های تکثیر شده در آزمایش های قبل جلوگیری به عمل آید. منابع زیادی برای آلودگی PCR وجود دارد که در زیر آمده است.

دستگاه الکتروفورز، لوله‌های سانتریفوژ، وارد کردن نوک سمپلر به ژل، ترموسایکلر، بلوک‌های حرارتی، روش های جمع‌آوری نمونه، آب یا سیستم خنک کننده، محیط آزمایشگاه، پرسنل آزمایشگاه و دستگاه هموژنیزه کننده بافت.

برای جلوگیری از آلودگی PCR آزمایشات باید در هود ویژه یا حداقل قسمتی از آزمایشگاه که صرفاً به این کار اختصاص داده شده قرار گیرد. تجهیزات و محلول هایی که مرتب در PCR کاربرد دارد باید تحت نگهداری ویژه باشد. هر ماده که قابل اتوکلاو کردن است باید استریل شود و از دستکش در تمام مراحل PCR استفاده کرد و همچنین عینک و روپوش آزمایشگاهی نیز لازم است. محلول هایی مانند بافر وdNTP باید در سیستم های بسته نگهداری شود و برای جلوگیری از آلودگی محلول پایه را باید به چند قسمت تقسیم نمود. در ذیل بعضی از روش ها که مانع آلودگی می‌شود ذکر شده است.

- اوراسیل – ان – گلیلوزیلاز (این آنزیم محصولات قبلیPCR را از بین می‌برد)
- اشعه ماوراء بنفش
- تیمار آنزیمی
- مدت زمان واسرشت شدن
- درجه حرارت واسرشت شدن
- تعداد چرخه
- استفاده ازdUTP به جایdTTP

مشکل PCR و راه حل آن

PCR علاوه بر تمام مزیت هایش، مشکلات مخصوص به خود را دارد؛ یکی از این مشکلات، مسأله آلودگی است. به دلیل حساسیت فوق العاده و قدرت تکثیر زیاد PCR، هر قطعه DNA خارجی که وارد محیط PCR شود، مورد تکثیر قرار گرفته و نتایج عجیب و دور از واقعیتی ممکن است به وجود آید. حساسیت این روش ایجاب می کند که مراقبت شدیدی اعمال گردد تا به این وسیله از تکثیر آلوده کننده‌هایی مانند DNAهای تکثیر شده از آزمایش های قبل جلوگیری به عمل آید.

گاهی نیز باقی مانده قطعات DNA حاصل از تکثیر DNAهای قبلی باعث آلودگی PCR می‌شود که در این مورد شستشوی زیاد و دقیق مشکل گشا است. ولی با تمام نکات گفته شده فوق برای جلوگیری از اشتباهات احتمالی در PCR، همواره باید کنترل های مثبت و منفی در هر سری از آزمایش ها وجود داشته باشند. همین طور قراردادن سمپلرها در جایی مطمئن، استفاده از سرپیپت‌های فیلتردار و تقسیم محلول ها و مواد به مقادیر کوچکتر، اقداماتی مفید در این جهت است.

در یک آزمایشگاه PCR، رعایت نکات ویژه این آزمایشگاه بسیار مهم است زیرا در صورتی که آلودگی در سیستم PCR ایجاد شود حذف آن بسیار دشوار، پرهزینه و وقت گیر خواهد بود.

یکی از منابع آلودگی اصلی در آزمایشگاه PCR مربوط به محصول PCR است که از طریق تانک الکتروفورز و دستگاه UV به نقاط دیگر آزمایشگاه منتقل می‌شود. پس از انجام الکتروفورز، بافر موجود در تانک الکتروفورز یک منبع بسیار قوی آلودگی است و چنان چه قطره کوچکی از آن در محیط آزمایشگاه یا اطراف تانک بریزد و خشک شود ذرات آئروسل حاصل از آن تا مدت ها باعث آلودگی فضای آزمایشگاه و مثبت شدن کاذب واکنش های PCR خواهد شد. این مساله معمولاً هنگامی اتفاق

@sarayedaneshjo

می‌افتد که ژل آگاروز از تانک الکتروفورز به دستگاه UV منتقل می‌شود. بنابراین، این دو دستگاه باید در حداقل فاصله از یک دیگر و ترجیحاً در کنار یک دیگر و در فضای ویژه‌ای که دارای لامپ UV و هواکش است، باشند و رفت و آمد در این فضا با تعویض کفش ها و روپوش صورت گیرد.

هر محصول واکنش چند میکرولیتری PCR می تواند استخری با ۱۵۰۰۰ گالن آب را آلوده نماید. این مقدار در روش Nested PCR به ۳۰۰۰۰ گالن می‌رسد. بدین معنی که پنج میکرولیتر از این حجم آب می تواند در PCR جواب مثبت کاذب ایجاد نماید. بنابراین واضح است که برای جلوگیری از بروز نتایج مثبت کاذب و آلوده شدن سیستم PCR باید اقدامات قاطع و دقیقی انجام پذیرد. مواردی از اقدامات اولیه مورد نیاز عبارتند از:

- در هنگام آزمایش نمونه‌ها از دستکش های یکبار مصرف استفاده شود و این دستکش ها پس از هر مرحله تعویض گردد
- نمونه‌های کلینیکی و نمونه‌های DNA استخراج شده در فریزر جداً از محل نگهداری کیت ها و مواد مربوط به PCR نگهداری شود.
- دمای آزمایشگاه باید ۲۰ الی ۲۵ درجه سانتیگراد باشد و دمای فریزر و یخچال با نصب جدول ثبت دما کنترل گردد.

فضای مورد نیاز برای آزمایشگاه PCR شامل سه فضای کاملاً مجزا است که باید توسط موانع فیزیکی از یکدیگر جدا باشند و ورود و خروج به هر یک از این فضاها با تعویض کفش ها و روپوش انجام گیرد. این فضاها و تجهیزات مورد نیاز آن ها عبارتند از:

۱) فضا جهت کار با نمونه‌های کلینیکی و استخراج DNA و RNA که دارای لامپ UV و هود لامینار باشد، این فضا بایستی کاملاً جدا از فضای آماده سازی واکنش های PCR و الکتروفورز باشد. لامپ UV دو ساعت قبل از شروع کار و دو ساعت بعد از آن روشن شود.

۲) تجهیزات اولیه مورد نیاز این مکان عبارتند از:

سمپلرهای مخصوص این فضا از حجم ۵ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر، میکروفیوژ ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، Vortex، تیوبها و رک مناسب، سمپلرهای مخصوص این فضا از حجم ۱ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر، فریزر $-20°C$ و یخچال $8\text{-}2°C$.

۳) مکان مناسب برای استقرار UV transilluminator و دستگاه PCR و تانک الکتروفورز که واجد لامپ UV و هواکش باشد. این فضا باید کاملاً جدا از دو فضای قبلی باشد و ورود و خروج به آن باید با تعویض کفش ها و روپوش انجام گیرد. پس از استفاده از محصولات PCR، تیوب های مربوط به آن ها در سطل مخصوص که ارتباطی با فضاهای دیگر آزمایشگاه نداشته باشد دور ریخته شود. لامپ UV دو ساعت قبل از شروع کار و دو ساعت بعد از آن روشن شود.

کاربردهای PCR

در ابتدای کشف روش PCR شاید فهم این که چرا PCR روش بسیار مفیدی است مشکل بود، اما امروزه با توجه به کاربردهای بسیار زیادی که در عرصه های مختلف علوم بیولوژی سلولی- مولکولی پیدا کرده است، این روش جزء تفکیک ناپذیری از این علوم شده است. در این بخش ما به ذکر برخی کاربردهای PCR خواهیم پرداخت.

به طور کلی موارد استفاده از PCR به شرح زیر می باشد:

۱. **تهیه نسخه‌های متعدد از یک ژن مورد نظر:** گاهی برای مطالعات بیولوژی مولکولی لازم است که یک ژن با نسخه‌های نسبتاً زیاد در دسترس باشد. بدین منظور می‌توان با استفاده از روش PCR ژن مورد نظر را در مقایسه با بقیه ژن‌ها تکثیر نمود.

@sarayedaneshjo

۲. **بررسی حضور یا عدم حضور یک ژن:** با استفاده از این روش می‌توان تشخیص داد که آیا یک ژن در یک سلول حضور دارد یا نه. گاهی نیز از این مطالعات برای بررسی وجود ژن های مختلف باکتری‌ها یا ویروس‌ها در بدن افراد استفاده می کنند.

۳. **تشخیص بیماری‌های قبل از تولد:** با استفاده از PCR و به کار گرفتن پرایمرهای مربوط به یک ژن بیمار و پرایمرهای مربوط به ژن سالم آلل آن می‌توان از تولد کودکان دارای بیماری‌های ژنتیکی جلوگیری کرد. برای این کار بعد از لقاح تخمک در آزمایشگاه، بعد از رسیدن تخمک به حالت ۱۰ سلولی، یک سلول را جدا کرده و با استفاده از پرایمرها از ژن مورد نظر PCR صورت می گیرد، اگر بعد از PCR منحصراً ژن سالم تکثیر پیدا کرد، این مفهوم هموزیگوت بودن سلول‌های جنینی و سالم بودن آن هاست.

۴. **تعیین جنسیت جنین:** معمولاً چند تخمک با چند اسپرم در آزمایشگاه لقاح می‌یابند و سپس اجازه تکثیر به سلول تخم داده و با رسیدن تخم به مرحله ده سلولی، یکی از سلول‌ها را جدا کرده و به وسیله پرایمرهای ویژه مربوط به کروموزوم y مورد PCR قرار می گیرد. کروموزوم y منحصراً در سلول‌های نر دیده می‌شود. اگر قطعه تولید نشده در PCR به وسیله الکتروفورز و به طور دقیق‌تر توسط ساترن بلاتینگ تشخیص داده شد، جنین از نوع پسر و در غیر این صورت دارای کروموزوم‌های xx خواهد بود.

۵. **تشخیص بیماری ها:** کشت میکروب ها که جهت تشخیص بیماری های عفونی در اکثر آزمایشگاه ها به کار می‌رود. اولاً زمان‌بَر بوده و ثانیاً باعث افزایش تعداد میکروب‌های بیماری زا و غیر بیماری زا در شرایط آزمایشگاهی می گردد. امروزه در برخی آزمایشگاه ها روش PCR جایگزین روش‌های کشت شده است. یعنی قطعه‌ای از ژن مربوط به میکروب بیماری زا مورد شناسایی قرار گرفته و پرایمرهای مربوط تولید می‌شوند، با استفاده از این پرایمرها می‌توان تشخیص داد که آیا ویروس ایدز در داخل بدن وجود دارد یا نه.

از روش PCR می توان جهت تشخیص سریع موتاسیون های ایجاد شده در بیماری های ژنتیکی بهره برد. به‌طور مثال تکثیر DNA ویروسی در نمونه های انسان باعث می شود بیماری روزها، هفته ها و حتی ماه ها قبل از شروع علائم بالینی تشخیص داده شود و البته می دانیم که درمان بسیاری از بیماری ها، خصوصاً سرطان های ویروسی غالباً در مراحل ابتدایی شروع بیماری موفقیت آمیزتر خواهد بود.

۶. **مطالعه مقادیر اندک DNA:** PCR توانائی اثبات شده ای برای استفاده از یک مولکول DNA به‌عنوان الگو در واکنش های تکثیری دارد. از این حساسیت حیرت انگیز می توان در بررسی های جنایی و دیرینه شناسی که مقدار DNA بسیار ناچیز است، استفاده نمود.

۷. **تکثیر RNA :** PCR تنها به تکثیر DNA الگو محدود نمی شود. مولکول های RNA هم اگر در ابتدا با آنزیم نسخه برداری معکوس (Reverse Transcriptase) به یک cDNA (complementary DNA) تک رشته ای تبدیل شود، قابل تکثیرند. پس از این مرحله، پرایمرهای PCR و پلی مراز Taq اضافه می شوند و آزمایش دقیقاً همانند روش استاندارد ادامه می یابد.

یکی از موارد استفاده از روش بالا که RT-PCR (Reverse- Transcriptase- PCR) خوانده می‌شود اندازه گیری مقادیر نسبی mRNA در بافت های مختلف یا در یک بافت در زمان های متفاوت است. مقدار mRNA در یک سلول عمدتاً بازتابی از فعالیت ژن والد است، بنابراین اندازه گیری مقدار mRNA تغییرات بیان ژن را در سلول نشان می دهد.

@sarayedaneshjo

۸. **مقایسه ژنوم های مختلف:** اگر پرایمرهایی که در PCR به‌کار می رود خیلی کوتاه باشند، مخلوطی از قطعات تکثیر شده به‌دست می آید . ممکن است به‌نظر آید که در هر صورت باید از این وضعیت جلوگیری کرد ولی به‌هر حال تکثیر تصادفی با پرایمرهای کوتاه یک روش مفید در فیلو ژنی (Phylogeny)، علم تحقیق درباره تاریخ تکامل و خطوط اجدادی گونه ها و سایر موجودات ، می باشد. نکته مهم این که فرم باندها که بعد از الکتروفورز محصولات PCR با پرایمرهای تصادفی دیده می شوند، بازتاب ساختمان کلی DNA است که به عنوان الگو به‌کار رفته است. اگر ماده اولیه، کل DNA سلول باشد، مدل باندها نشان دهنده ساختار ژنوم سلول است. تفاوت های بین ژنوم دو ارگانیسم را (اگر مربوط به یک گونه یا دو گونه متفاوت باشند) می توان با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای تصادفی تعیین کرد.

۹. **در شناسایی عوامل عفونی (مانند شناسایی ویروس هپاتیت C) و تشخیص سریع و تأییدی عوامل عفونی:** یکی از مشکلات قابل توجه در زمینه انتقال خون و فرآورده‌های خونی، خطر انتقال عوامل عفونی همچون ویروس هپاتیت B و C و ویروس لوسمی سلول‌های T انسان (HTLV) و HIV می‌باشد.

از راهکارهای قابل توجهی که تاکنون برای رفع این مشکل ارائه شده و به کاهش میزان انتقال این عوامل عفونی کمک کرده است، می‌توان به طراحی آزمایش‌های سرولوژیکی حساس برای غربالگری آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت بی (HBs Ag) و آنتی‌بادی‌های تولید شده HTLV و HIV و HCV اشاره کرد. اما با این حال باز مواردی از ابتلای افراد به این عوامل گزارش شده است که از جمله علل آن می‌توان به تغییرات آنتی ژنیک ویروس، آلودگی با سروتیپ‌های مختلف ویروسی، ناقلان خاموش از نظر ایمونولوژی یا ناقلین پنهان و یا نبود آنتی بادی در مراحل اولیه بیماری اشاره نمود.

در دهه اخیر به منظور رفع این مشکل، روش‌های مبتنی بر اسیدنوکلئیک (NAT (Nucleic Acid Testing برای شناسایی نوکلئیک اسید ویروس‌ها(DNA یا RNA) توسعه یافته‌است. از مزایای NAT می‌توان به بررسی مستقیم واختصاصیت بسیار زیاد آن برای ژنوم یک عامل عفونی و تعیین میزان بارگیری ویروس در خون، نسبت به روش‌های سرولوژیک و یا روش‌های جداسازی ویروس (به منظور شناسایی آن عامل عفونی) اشاره نمود. با توجه به کارایی بالای NAT برای غربالگری خون‌های اهدایی با این حال استفاده از آن در مقیاس وسیع به صورت محدود بوده که از دلایل آن به هزینه زیاد و وقتگیر بودن این روش است .

به عنوان مثال ۶۳ نمونهٔ سرمی بیماران مشکوک به هپاتیت B مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان بقیه ا.. (عج) برای تشخیص دقیق ابتلا به این ویروس مورد مطالعه قرار گرفتند. برای بررسی ایمنولوژیک HBsAg از روش کمی لومینسانس ایمنواسی (Chemiluminescence Immuno Assay) و برای تشخیص مولکولی یا NAT از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR استفاده گردید. یافته های پژوهش نشان داد که با روش PCR تمامی ۶۳ نمونه (۱۰۰ درصد) نتایج مثبت داشتند در حالیکه با روش سنجش ایمنولوژیکی ۵۷ مورد (۹۰/۵ درصد) مثبت و ۶ مورد (۹/۵ درصد) منفی بودند که در صورت عدم تشخیص سریع این گونه بیماران سیر پیشرفت بیماری برای شخص بیمار وجامعه خطر ساز می باشد. لذا می توان گفت در برخی موارد حساسیت روش های ایمنولوژیکی کمتر از روش مولکولی PCR می باشد.

۱۰. **در بررسی مقاومت های دارویی عوامل عفونی**

۱۱. **در مولکولار تایپینگ عوامل عفونی**

@sarayedaneshjo

انواع PCR:

۱. Hot start PCR:

عبارت است از جدا کردن یک یا چند ترکیب مهم PCR (ترجیحاً آنزیم پلیمراز)، به طوری که بلافاصله بعد از دناتوراسیون DNA هدف به واکنش اضافه می شوند (استفاده از PCR gem و آنتی بادی آنزیم پلیمراز)

- Hot start به کمک آنتی بادی: مونوکلونال آنتی بادی ضد آنزیم پلیمراز را به واکنش اضافه می کنند. درنتیجه فعالیت پلیمرازی آنزیم را مهار می کند. هنگامی که دمای واکنش به ۹۴ درجه می رسد آنتی بادی دناتوره می شود و دوباره پلیمراز فعال می شود.
- Hot start به کمک Ampliwax: به دیواره لوله های مخصوص این کار به نوعی واکس آغشته است که بعد از کمی گرم کردن ذوب شده و روی واکنش را می پوشاند. آنزیم پلیمراز را روی واکس قرار می دهند. در دمای ۹۴ درجه این واکس بخار می شود و آنزیم پلیمراز با واکنش تماس پیدا می کند.

۲. Touch down PCR:

در این روش دمای آنیلینگ ازدمای بالاتر از Tm به ندرت کاهش می یابد و موجب کاهش محصول کاذب و پرایمر دایمر می شود.

۳. Nested PCR :

در PCR تک سلولی برای به دست آوردن محصولات قابل تشخیص از توالی های منحصر به فرد با استفاده از یک سیستم تشخیصی بر مبنای اتیدیوم برماید، حدود ۵۰ تا ۶۰ چرخه مورد نیاز است. به دلیل آنکه آنزیم Taq پلیمراز تقریباً پس از ۴۰ چرخه اشتباهاتی را به درون محصول PCR وارد می کند، پس از چنین تعداد چرخه بالا که برای PCR تک سلولی مورد نیاز است، محصولات غیر اختصاصی ایجاد می شود. این مشکل باعث ایجاد روش Nested PCR یا PCR آشیانه ای شد. در این روش به منظور ارتقای ویژگی و حساسیت از دو جفت پرایمر و دو مرحله PCR پشت سر هم استفاده می شود. مرحله اول PCR محصولاتی تولید می کند که در برگیرنده محل جهش هستند اما میزان آن ها به اندازه ای که قابل رویت باشد نیست. محصولات به دست آمده از واکنش اول به یک لوله جدید منتقل شده و با استفاده از یک سری جدید پرایمر به منظور رسیدن به یک میزان قابل تشخیص تکثیر می شوند. پرایمرهای مرحله دوم نسبت به مرحله اول درونی تر هستند اما همچنان دربرگیرنده محل جهش می باشند. این راه حل علاوه بر اینکه اختصاصیت محصول PCR را افزایش می دهد، خطر آلودگی با محصولات PCR قبلی را نیز کاهش می دهد. از معایب این روش باقی ماندن در هر دو مرحله اول و دوم است.

همچنین در مواقعی که DNA هدف در نمونه مورد آزمایش کم باشد برای جلوگیری از بالابردن مقدار DNA و مهار واکنش از این روش استفاده می شود.

مزایای این روش تغییر یافته PCR عبارت است از:

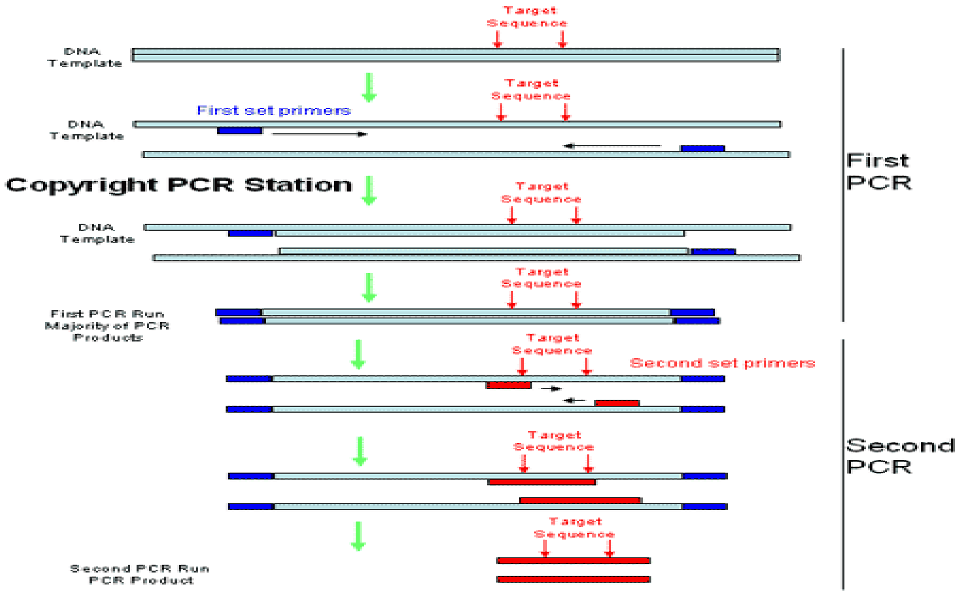
نیاز به پروب (کاوشگر) و تأییدهای بعدی کمتر است.

حساسیت در این روش به میزان زیادی بالاتر است.

به دلیل انتقال محصول PCR دور اول به لوله جدید، ممانعت کننده‌ها رقیق می‌شود.

این روش در تعیین جنسیت جنین در سه ماهه اول بارداری استفاده شده و از این طریق توانسته‌اند بیماری‌های وابسته به جنس را تعیین کرده و از تولد کودکان بیمار جلوگیری کنند.

@sarayedaneshjo



Nested PCR

۴. Long distance PCR

با این روش قطعات بیش از 20 kb همانند سازی می شوند. برای انجام این نوع PCR باید DNA ژنومی از کیفیت بالایی برخوردار باشد و پرایمر ها به دقت طراحی شوند. برای اینکار از klon taq استفاده می شود. این آنزیم نسخه ای از DNA poly است که قسمت N ترمینال آن حذف شده است و با pfu poly به نسبت ۱۸۰ به ۱ مخلوط می شود و فاقد خاصیت '۵ اگزو نوکلئازی است.

۵. Multiplex-PCR

در این روش از چندین جفت پرایمر اختصاصی برای هدف های مختلف استفاده می شود. با استفاده از پرایمرهای مختلف می‌توان چندین جایگاه را به طور همزمان در یک واکنش منفرد تقویت کرد. هر PCR چندگانه تنها به بهینه سازی مجموعه پرایمرهای دخیل نیاز دارد و تاکنون حداکثر تعداد توالی هایی که به صورت همزمان از یک سلول تقویت شده اند (چه به صورت تشخیص با اتیدیوم برماید و چه با روش PCR فلورسنت) تا ۷ جایگاه بوده است.

از کاربردهای این روش می‌تواند شامل موارد زیر باشد:

۱ - بخش‌های بزرگی از یک DNA (هدف)، جهت جست‌وجوی تغییرات می‌تواند بررسی شود. برای مثال کشف نقص‌ها در بیماری دیستروفی عضلانی دوشن یا کشف بخش‌های مختلف IS6110 و IS986 در مایکروباکتریوم توبر کلوزیس عامل بیماری سل.

۲- بخش‌های غیرمربوط به هم در ژنوم هدف می‌تواند مورد آزمایش واقع شود.

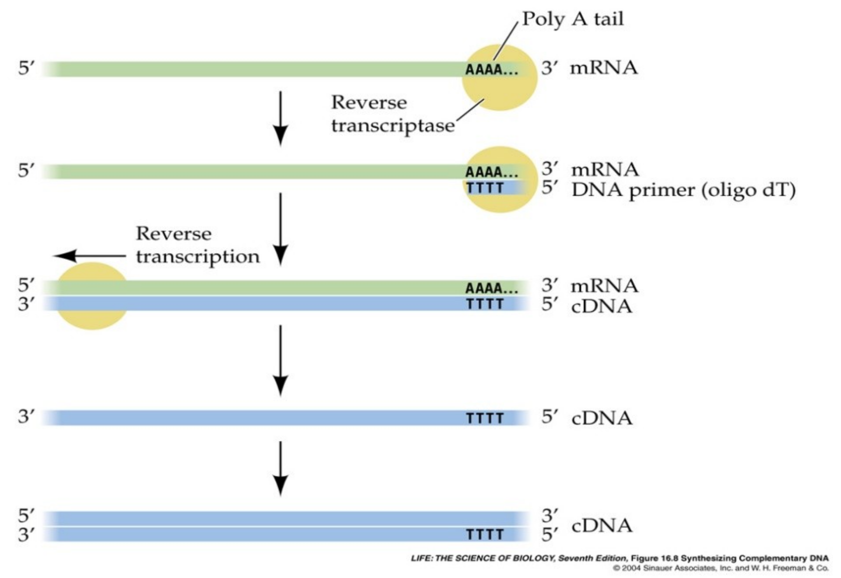
۳- می‌توان از طریق این روش با پرایمرهای مختلف به جست‌وجوی عوامل مختلف پرداخت، مانند شناسایی عوامل شایع منژیت. این روش بیشتر برای شناسایی جایگاه‌هایی از ژن‌ها به کار می‌رود که انواع زیادی از جهش در آن ها به وقوع می‌پیوندد.

@sarayedaneshjo

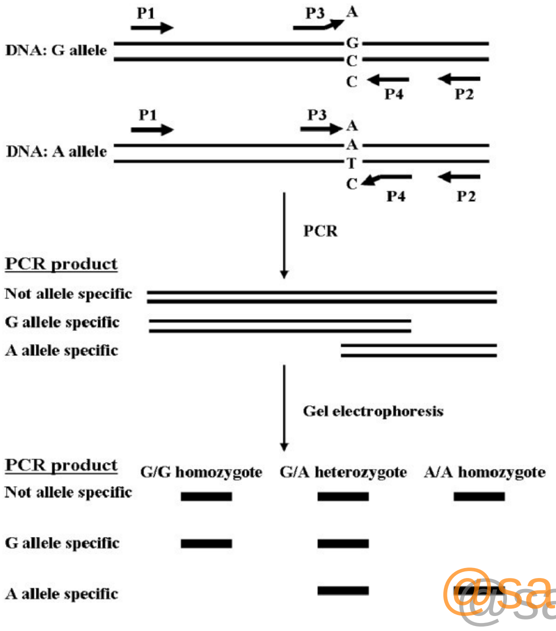
۶. RT-PCR

این روش به PCR نسخه‌برداری معکوس نیز معروف است که ماده اولیه در آن RNA است. اولین مرحله در این روش تبدیل RNA به DNA (DNAای که مکمل توالی‌های mRNA است) توسط آنزیم نسخه‌بردار معکوس می باشد (Reverse Transcriptase). برخی از موجودات مانند برخی از ویروس‌های RNAدار، ژنومشان تنها از RNA ساخته شده است. بعضی از ویروس‌ها مانند ویروس هپاتیت B هرگز به شکل DNA مابین در اثر آنزیم نسخه‌بردار معکوس درنمی‌آید. آنزیم نسخه‌بردار معکوس (RT) در این روش از "Avian Myeloblastosis Virus (AMV)" و "Moloney Murine LeuKemia Virus (MMLV) " به‌دست آمد.

کاربرد این آنزیم به‌دلیل آن‌که آنزیم به حرارت حساس بود در ابتدا پایین بود ولی با کشف باکتری به نام "ترموس ترموفیلوس" یک DNA پلیمر از مقاوم به نام Tth بهبود یافت که در حضور یون Mn^{2+} دارای فعالیت نسخه‌برداری معکوس است و در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد توسط این آنزیم از روی RNA، DNA ساخته می‌شود و سپس Mn^{2+} اضافی توسط اتیلن گلیکول تترااستیک اسید (EDTA) حذف می‌شود و سپس این آنزیم از DNAای که خود ساخته استفاده و آن را تکثیر می‌کند.



RT-PCR



۷. ARMS-PCR

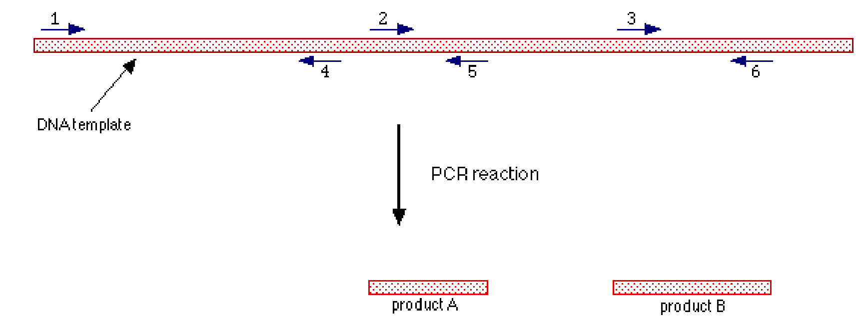
این روش تکثیری قدرتمند برای مشخص کردن جهش‌های نقطه‌ای است. در این روش از پرایمرهای جهش یافته و طبیعی در دو میکروتیوب جداگانه استفاده می‌شود. اگر عمل پلیمریزاسیون در لوله حاوی پرایمر طبیعی انجام شود، نشان‌دهنده نبود جهش نقطه‌ای در باز مورد نظر است و اگر عمل پلیمریزاسیون در لوله حاوی پرایمر جهش

@sarayedaneshjo

یافته انجام شود، نشان‌دهنده حضور جهش نقطه‌ای در باز مورد نظر است. نام‌های دیگر این روش عبارتند از MAMA-PCR مخفف Mismatch Amplificatin Mutation Assay و COP-PCR مخفف Competitive Oligonucleotide Primming. از این روش می توان در تشخیص موتاسیون های مولد مقاومت دارویی در باکتری‌ها استفاده کرد.

۸ RAPD –PCR (Random Amplified Polymorphic DNA)

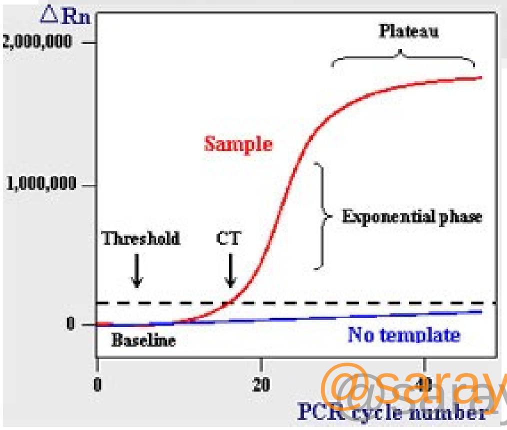
این نوع PCR با پرایمرهایی به نام RAPD یا پرایمر های اختیاری انجام می گردد. پرایمرهای ۱۰ جفت بازی با توالی تصادفی طراحی می شوند و در PCR مورد استفاده قرار می گیرند. توالی و اندازه باند مشخص نیست. این پرایمرها پلی مرفیسم در موجودات و گیاهان را بدون شناخت توالی نوکلئوتیدی ردیابی می کنند .



RAPD PCR

۹. Real-Time PCR

به علت ورود نسل جدیدی از ترموسایکلرها با سیستم فلورومتری که اجازه پایش پیوسته خاصیت فلوئورسانس محصول PCR در زمان جمع شدن را می‌دهد، این روش ابداع شد. در این روش از کاوشگرها یا پروب‌های هیبریداسیون نشان‌دار شده با رنگ‌های فلورسانس در انتهای '۵ یا '۳ استفاده می‌شود. که امکان پایش پیوسته محصول PCR را بدون جداسازی آن ها در روش‌های الکتروفورز در ژل آگاروز یا ژل پلی آکریل آمید می‌دهد. این سیستم در سال ۱۹۹۲ کشف شد. این روش به دلیل کاهش زمان چرخه های PCR، حذف مرحله Post-PCR و کاربرد نشانگرهای فلوروژنیک و روش‌های حساس آشکارسازی تابش آن ها باعث افزایش سرعت این سیستم نسبت به سیستم PCR معمولی شده است. سازندگان و کاربران این روش سعی می‌کنند محصول PCR کوچک‌تر طراحی کنند تا سرعت افزایش یابد اما تجربه نشان داده که کاهش اندازه محصول لزوماً بازده PCR را بهینه نمی‌کند. البته این روش دارای معایبی نیز هست از جمله می‌توان به عدم ناتوانی در مشخص کردن اندازه محصول بدون باز کردن سیستم و ناسازگار بودن برخی پلت فرمها با شیمی برخی رنگ‌های فلور وژنیک اشاره کرد. برای شناسایی بسیاری از ویروس‌های عامل بیماری‌های انسان از این روش استفاده شده است.



Real-time PCR

@sarayedaneshjo

بایدها و نبایدها در PCR

۱ –هنگام تهیه واکنش نمونه کنترل مثبت را آخر کار تهیه کنید.

۲ –مراحل pre-PCR و Post-PCR جدا از هم انجام گیرد.

۳ – برای استفاده ازهر ماده از نوک سمپلر جدا گانه استفاده کنید.

۴ – مواد ذخیره آزمایشگاه را تقسیم کرده و فریز کنید و هر چند وقت صحت آن ها راکنترل کنید.

۵ –هنگام استفاده هر لوله را spin کنید تا موادی که به اطراف یا درب میکروتیوب چسبیده اند در پایین جمع شوند.

انجام آزمایش PCR:

در این جا نمونه ای از محاسبه مقادیر لازم برای یک PCR معمولی آورده شده است. توجه داشته باشید که این مقادیر ممکن است در PCRهای مختلف جهت بهینه سازی PCR در یک دامنه مشخص تغییر کند.

Material	Final concentration	Volume (1X)	Volume (4.1X)	Samples
10X buffer	1X	2	8.2	**1.**Negative control 2.Positive control 3.Salting out DNA 4.Kit DNA
dNTP (10mM)	200µM	0.4	1.6	
$MgCl_2$ (50mM)	1.5mM	0.6	2.5	
Primer F (10^4nM)	250nM	0.5	2	
Primer R (10^4nM)	250nM	0.5	2	
Taq DNA polymerase (5U/µL)	1U	0.2	0.8	
ddH_2O	-	13.8	56.6	
DNA or cDNA	50- 200 ng	2	-	
Total volume of reaction	-	20	-	

*: 0.2X اضافه برای کاهش خطای sampling محاسبه می گردد.

و طبق شرایط دمایی زیر در دستگاه PCR قرار می‌دهیم.

95°c→5'
94°c→30″ ⎫
57°c→30″ ⎬ 35 cycle
72°c→30″ ⎭
72°c→5'

بعد از اتمام واکنش بالا، جهت بررسی نمونه‌ها را برروی ژل آگاروز ۲٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز می نماییم.

@sarayedaneshjo

آشکار سازی و تجزیه و تحلیل محصول PCR

محصول PCR یا Amplicon شامل قطعه ای از DNA میان دو پرایمر و تکثیر شده توسط پرایمر جلویی و عقبی است و دارای طول مشخصی است. بطور معمول سه نوع اطلاعات از تجزیه وتحلیل فراورده های PCR بدست می آید.

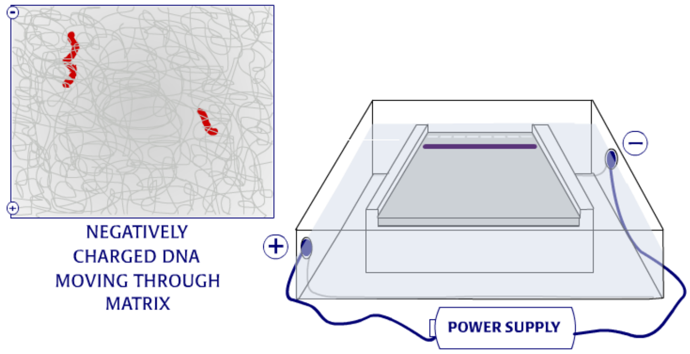
۱ – آشکار ساختن توالی DNA الگو و تغییرات آن

۲ – مقدار محصول تکثیر شده که مؤید مقادیر مطلق یانسبی DNA یا RNA الگوی اولیه است.

۳ – تجزیه وتحلیل توالی، به وسیله تعیین توالی مستقیم محصول یاهیبریداسیون با پروبها (Probes). محصول PCR به طور معمول کوچکتر از ۱۰kb است. روش معمول جهت مشخص کردن و دیدن محصول PCR، الکتروفورز آن بر روی ژل آگاروز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید یاژل پلی آکریل آمید و رنگ آمیزی نیترات نقره می باشد. اتیدیوم بروماید یک رنگ فلوئورسنس است وتوانایی ورود در DNA دو رشته ای را دارد. بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، ژل بر روی دستگاه ترانس لومینیتور قرار داده می شود و باندهای DNA با تابش نور UV به آن آشکار می گردد. می توان از ژل عکس گرفت. در ژل نشانگر اندازه (DNA size marker) و همین طور کنترل مثبت و منفی PCR نیز الکتروفورز می گردد تا بتوان هم اندازه دقیق محصول و هم صحت انجام آزمایش را اثبات نمود.

جهت دیدن محصول PCR در ژل باید از آگاروزهای استاندارد (DNA-grade) استفاده نمود. با این حال، ژل آگارز با قدرت تفکیک بالا توانایی جداسازی و مشاهده قطعات ۱۰bp-۲kbp را دارند و جهت تفکیک بیشتر محصولات کوچک PCR، می توان از آن ها استفاده نمود. برای محصولات کوچک از نظر اندازه، یا تفکیک بین محصولات کوچک و نزدیک از لحاظ اندازه، از ژل پلی آکریل آمید استفاده می شود.

۳) الکتروفورز



تعریف:

الکتروفورز به عنوان روش اصلی در جداسازی و مشاهده مستقیم قطعه های اسید نوکلئیک به کار گرفته می شود. اساس این روش بر این واقعیت بنا شده است که در pH خنثی اسیدهای نوکلئیک ترکیباتی پلی آنیونی بوده، چرا که حاوی تعداد زیادی گروه فسفات با بار منفی در اسکلت قند– فسفات می باشند.

این بدان معنی است که اگر در یک میدان الکتریکی قرار بگیرند به سمت قطب مثبت حرکت می کنند. دو نوع ژل برای الکتروفورز به کار می رود که هر کدام بر میزان جدا کردن قطعه ها تأثیری عمده دارد. درجه جدا شدن قطعه ها به میزان خلل و فرج ژل نیز بستگی دارد. دو نوع ژل رایج عبارتند از: آگارز و پلی آکریل آمید. آگاروز از جلبک های دریایی استخراج می شود که به صورت پودر خشک تجاری قابل تهیه است. این ژل را در بافر مناسب تهیه کرده و به وسیله گرما ذوب می کنند.

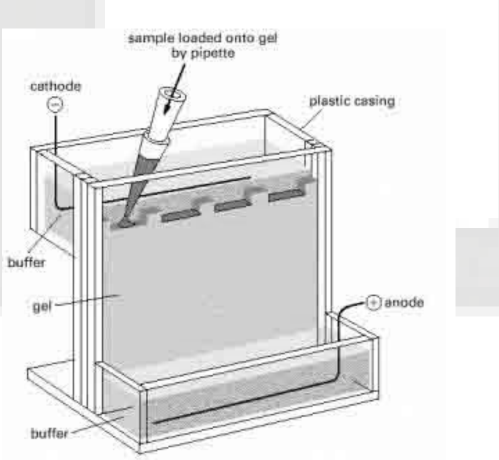
@sarayedaneshjo

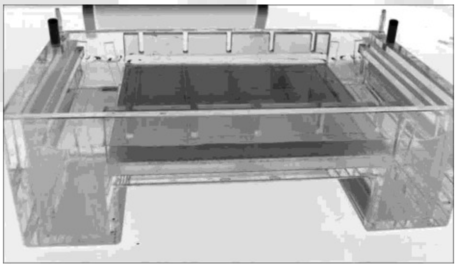
آگاروز پس از سرد شدن، جامد می شود. ژل پلی آکریل آمید عموماً برای جداسازی اسیدهای نوکلئیک کوچک به کار برده می شود، زیرا خلل و فرج آن کوچکتر از آگاروز است.

الکتروفورز با قرار دادن نمونه روی ژل و ایجاد اختلاف پتانسیل در طول ژل انجام می گیرد. سرعت حرکت قطعات سبکتر نسبت به قطعات سنگین تر بیشتر بوده و به همین دلیل قطعات مختلف DNA از هم جدا شده و نوارهای مختلفی را تشکیل می دهند. پس از جوشاندن آگاروز در بافر TAE(1X) فرصت داده می شود تا دمای ژل به ۵۵ درجه سانتیگراد برسد، سپس اتیدیوم بروماید با غلظت 0.1mg/ml به آن افزوده می شود و در سینی مخصوص ژل که درآن شانه مربوطه نیز تعبیه شده است، ریخته می شود. پس از ۱۰– ۱۵ دقیقه که ژل بسته شد شانه را از آن خارج نموده و ژل را داخل تانکی می گذاریم که درون آن از بافر TAE(1X) (بافری که با آن ژل درست می کنیم) پرشده است. بافر تا اندازه ای است که روی سطح ژل را بپوشاند. نمونه ها را با استفاده ازبافرسنگین کننده (loading buffer) درژل بارگیری می نماییم و جریان برق برقرار می شود. حرکت DNA از قطب منفی به قطب مثبت می باشد. ولتاژ مناسب بین ۵ -۱۰ولت به ازای هر سانتیمتر ازطول ژل می باشد. پس از اینکه رنگ برموفنل بلو به اندازه کافی مهاجرت کرد تأمین کننده برق (power supply) خاموش می شود و ژل بر روی دستگاه ترانس لومیناتور یا Gel doc بررسی می شود. ازآنجا که اتیدیوم برومایدیک ماده فلورسنت است محل DNA راروی ژل مشخص می کند.

لازم به ذکر است که برای الکتروفورز از همان بافری استفاده شود که در ساختن ژل از آن استفاده شده است. در الکتروفورز علاوه بر بافر TAE (Tris-Acetate-EDTA)، از بافر TBE (Tris-Borate-EDTA) نیز استفاده می شود.

دستگاه power supply.
جهت تامین جریان الکتریکی





تانک الکتروفورز عمودي.
بيشتر براي ژل آکريل آميد استفاده مي شود

تانك الكتروفورز افقي.
براي ژل آگارز استفاده مي شود

@sarayedaneshjo

تهیه ژل آگارز ۲٪:

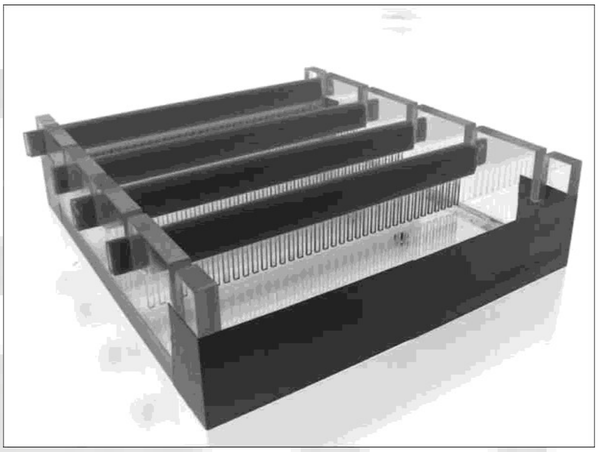
-۰/۴gr از پودر آگارز را وزن می کنیم و به مقدار ۲۰ میلی لیتر TAE 1X یا TBE 1X در ارلن اضافه می کنیم.

-درب ارلن را با آلومینیوم فویل بسته و ارلن را بر روی حرارت قرار می دهیم. صبر می کنیم تا آگارز در بافر حل شده و محلول یکنواختی بدست آید.

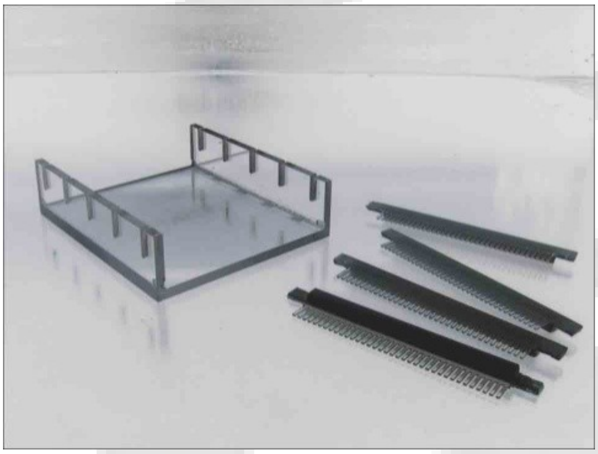
-ارلن را از روی حرارت برداشته و صبر می کنیم تا به دمای ۵۵ درجه سانتیگراد برسد.

-۱/۵µL اتیدیوم برماید با غلظت 10 µg/mL اضافه نموده و مخلوط کرده داخل سینی ژل آماده که شانه در آن قرار گرفته است می ریزیم و حباب ها را خارج می کنیم. بعد از اینکه ژل بست، نمونه ها را بارگذاری می نماییم. پس از اینکه رنگ برموفنل بلو حدود ۳/۴ ژل را پیمود، می توان ژل را در دستگاه Gel doc قرار داده و محصولات PCR را مشاهده نمود.

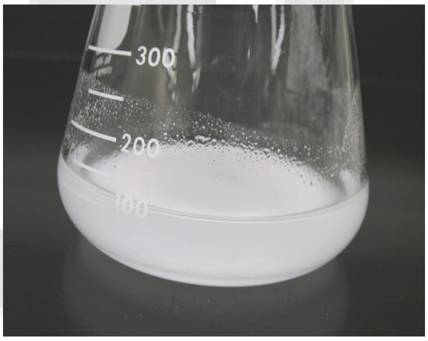
توضیح: دوطرف سینی ژل را با تیغه های پلاستیکی یا چسب محکم می کنیم تا درزهای آن بسته شود. آنگاه ژل را در آن می ریزیم.



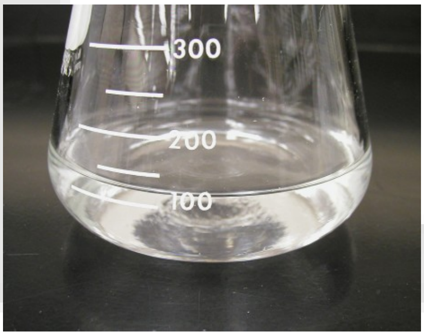
مسدود کردن دو طرف سيني با چسب



سيني ژل به همراه شانه



حل كردن پودر آگارز در



شفاف شدن ژل آگارز پس از

@sarayedaneshjo

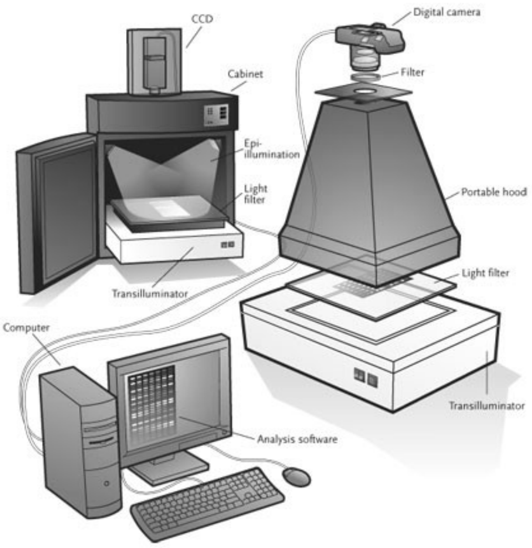
رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید:

می توان برای کاهش آلودگی ژل را پس از الکتروفورز رنگ آمیزی و مشاهده نمود. بدین ترتیب که ژل را بدون اتیدیوم برماید می سازیم و نمونه ها را بارگذاری می کنیم. پس از اتمام الکتروفورز ژل آگارز را به ظرفی که حاوی 0.5 µg/mL اتیدیوم برماید است منتقل نموده و به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در آن قرار می دهیم. سپس با دستگاه Gel doc نتایج را بررسی کنیم.

رنگ آميزي ژل آگارز با

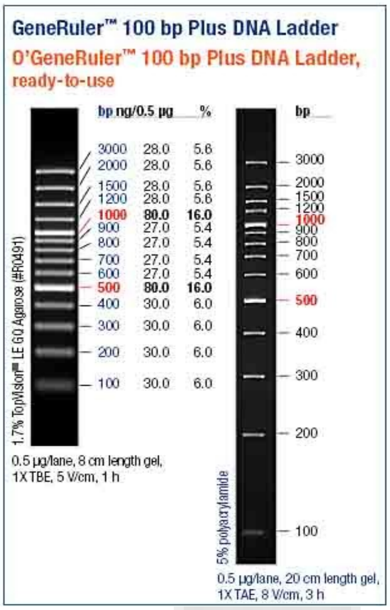
بررسی نتایج PCR با دستگاه Gel documentation:

دستگاه gel documentation دارای قسمتهای مختلفی است. یک ترانس لومیناتور UV دارد که ژل پس از رنگ آمیزی بر روی آن قرار می گیرد. تابش UV به ژل باعث می شود که اسیدهای نوکلئیک قابل مشاهده گردند. این دستگاه مجهز به یک دوربین دیجیتال با فیلتر UV است و قادر است از ژل عکس بگیرد. سپس این عکس به کامپیوتر متصل به دستگاه منتقل شده و نتایج بررسی می گردد.



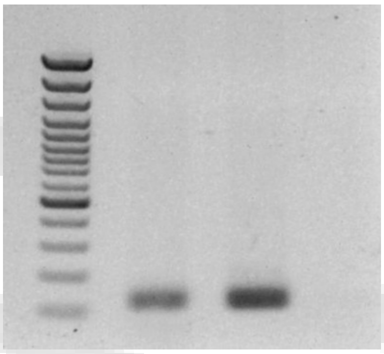
دستگاه Gel documentation

@sarayedaneshjo



تعیین اندازه قطعه تکثیر شده در PCR:

برای تشخیص اندازه باند حاصل از PCR و اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، نیاز به استفاده از یک نشانگر اندازه یا سایز مارکر (Ladder) داریم. این نشانگرها به صورت تجاری قابل تهیه هستند و دامنه متفاوتی از باندها را نشان می دهد که با توجه به سایز قطعه مورد نظر خود یکی از آن ها را انتخاب می کنیم. این نشانگر در کنار محصولات PCR در یکی از چاهکها بارگذاری می شود.



عکس تهیه شده از ژل آگارز با دستگاه gel doc: باند مورد نظر 120bp می باشد.

L: Ladder 100bp

Test: نمونه DNA مورد مطالعه

PC: کنترل +

NC: کنترل -

اتیدیوم برومااید

این ماده موتاژن و سرطانزاست. از طریق پوست، چشم و دستگاه تنفسی می تواند نفوذ کند.

– هنگام کار با اتیدیوم بروماید از دستکش های پلاستیکی و عینک های محافظ و ماسک استفاده کرد.

– توزین اتیدیوم بروماید حتماً باید در مکان بسته بدون جریان شدید هوا با استفاده از ماسک و دستکش دو لایه انجام شود.

– زباله های آلوده به اتیدیوم بروماید، بافرها و ژل های آلوده به طور مجزا دفع شود.

– دستکش و سایر لوازم آلوده به اتیدیوم بروماید را هرگز از اتاق UV خارج نکنید.

– در صورتی که لباس یا پوست به اتیدیوم بروماید آغشته شود، باید فوراً لباس آلوده را از تن خارج کرد و پوست را با مقدار فراوان آب و صابون شستشو داد.

– در صورت آلوده شدن چشم باید آن را با آب فراوان به مدت حداقل ۱۵ دقیقه شستشو داد.

– در صورت بروز هر حادثه ای در حین کار با اتیدیوم بروماید مسئول ایمنی یا مسئول آزمایشگاه را در جریان قراردهید.

-ساخت بافر TAE 50X

روش تهیه ۵۰۰ میلی لیتر 50XTAE:

– ۱۲۱ گرم از پودر Tris Base وزن کرده و در حدود ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر در ارلن ۱۰۰۰ میلی لیتر اضافه می کنیم.

– سپس ۲۸/۵۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال به محلول فوق اضافه می کنیم.

– ۵۰ میلی لیتر محلول ۰/۵ مولار EDTA با pH=8 را به محلول می افزاییم.

@sarayedaneshjo

– نهایتاً حجم محلول را با آب مقطر دیونیزه به ۵۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

-ساخت بافر TBE 5X:

روش تهیه ۱۰۰۰ میلی لیتر از TBE5X:

– حدود ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه را داخل یک ارلن ۱۰۰۰ میلی لیتری ریخته و مواد زیر را در آن حل می کنیم:

۱) ۵۴ گرم Tris base (پودر)

۲) ۲۷/۵ Boric acid (پودر)

– بعد از حل کردن مواد فوق ۲۰ میلی لیتر از محلول EDTA ۰/۵ مولار با pH=8 به آن اضافه کرده و در نهایت حجم محلول را توسط استوانه مدرج با آب مقطر دیونیزه به ۱۰۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

– برای الکتروفورز معمولا از بافرهای 1X استفاده می شود که از رقیق کردن بافرهای 50X و 5X تهیه می شود.

- ❖ **نکته: این بافرها را در تانک های الکتروفورز ریخته و بسته به شرایط کار هر چند مدت عوض می شود.**

@sarayedaneshjo

منابع:

۱. تشخیص ژنتیکی پیش کاشتی، اهمیت، کاربردها و چشم انداز. دکتر محمدرضا نوری دلویی، علی رشیدی نژاد. مجله طب و تزکیه، سال شانزدهم، پاییز و زمستان ۸۶، صفحه ۸۹-۷۰

۲. مقایسه روش ایمونوکمی لومینسانس با PCR برای تشخیص ویروس هپاتیت B در بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان بقیه الله- مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام – دوره پانزدهم، شماره دوم، تابستان ۸۶

۳. PCR، مبانی و کاربردهای آزمایشگاهی، محسن کریمی و سیروس زینلی. نشر اندیشه ظهور. ۱۳۸۳

۴. شاخص های برجسته برای بهینه سازی واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)، محمدرضا نژادمقدم و محمدحسین مدرسی. نشر سازمان انتشارات جهاد دانشگاهی. ۱۳۸۴

5. Gene cloning and DNA analysis: an introduction. Terence A. Brown
6. PCR (Basics S.). M.J. McPherson S. Moller A. Graham
7. PCR Applications: Protocols for Functional Genomics . Michael A. Innis, David H. Gelfand, John J. Sninsky
8. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Elizabeth van Pelt-Verkuil, Alexander van Belkum, John P. Hays
9. Molecular Diagnostic PCR Handbook Gerrit J. Viljoen, Louis H. Nel, John R. Crowther
10. Clinical Applications of PCR (Methods in Molecular Medicine). Y. M. Dennis Lo
11. PCR Strategies. Michael A. Innis, David H. Gelfand, John J. Sninsky
12. Applied molecular genetics. Roger Miesfield
13. Molecular Cloning. Sambrook *et.al*
14. Molecular Cell Biology. Lodish *et.al*

@sarayedaneshjo